

**КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЦИТОХРОМНОГО *bf* КОМПЛЕКСА. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДАННЫМ, ПОЛУЧЕННЫМ НА СУСПЕНЗИИ ТИЛАКОИДОВ**

**Лебедева Г.В., Камали М. Джалал, Демин О.В., Беляева Н.Е.,  
Ризниченко Г.Ю.**

(Москва)

Разработана кинетическая модель цитохромного *bf* комплекса в предположении функционирования Q-цикла Митчелла. *bf* комплекс рассматривался как мембранный фермент, катализирующий перенос электронов от пластохинола на пластоцианин, сопряженный с переносом протонов из стромы хлоропласта в люмен тилакоида. В модели учтена зависимость скоростей реакций электронного переноса от величины трансмембранного электрического потенциала. Модель применена к описанию экспериментальных данных по регистрации кинетики окислительно-восстановительных превращений цитохромов *b* и *f*, пластоцианина, а также процесса закачки протонов в люмен тилакоида после насыщающей вспышки света. Произведена идентификация параметров модели.

**KINETIC MODEL OF CYTOCHROME *bf* COMPLEX.  
FITING OF MODEL PARAMETERS TO EXPERIMENTAL  
DATA OBTAINED ON THYLAKOID SUSPENSION.**

**G.V. Lebedeva, M. Jalal Kamali, O.V. Demin, N.E. Belyaeva,  
G.Yu.Riznichenko**

(Moscow)

Kinetic model of cytochrome *bf* complex was developed in assumption of Q-cycle operation. *bf* complex was considered as a membrane enzyme catalyzing electron transfer from plastoquinol to plastocyanin, coupled with proton translocation from chloroplast

stroma to thylakoid lumen. The dependence of the electron transfer rates on the value of transmembrane electric potential was taken into account. The model was applied to description of experimental data on registration of flash-induced turnover of cytochromes *b* and *f*, plastocyanin and kinetics of proton deposition in thylakoid lumen. Estimation of model parameters was performed.

Цитохромный *bf* комплекс, наряду с фотосистемами I и II (ФС I и ФС II), является одним из основных пигментбелковых комплексов, локализованных в тилакоидной мембране хлоропласта и вовлеченных в процесс транспорта электронов в первичных (световых) процессах фотосинтеза. В электронтранспортной цепи фотосинтеза цитохромный комплекс занимает центральное положение между ФС II и ФС I, контролируя общую скорость транспорта электронов от первичного донора к терминальному акцептору, и обеспечивая баланс между притоком электронов (от ФС II в случае нециклического и от ферредоксина в случае циклического транспорта) и оттоком электронов из ФС I. Важнейшей функцией цитохромного комплекса является сопряжение транспорта электронов по электронтранспортной цепи с формированием электрохимического потенциала протонов ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) на мембране тилакоида, который используется для синтеза АТФ. С точки зрения энзимологии *bf* комплекс является пластохинол-пластоцианин оксидоредуктазой, т.е. катализирует окисление пластохинола и восстановление пластоцианина. Согласно современным данным [1-4], основными структурными элементами цитохромного комплекса, участвующими в процессах транспорта электронов и транслокации протонов, являются железо-серный центр Риска ( $\text{FeS}_R$ ), цитохром *f*, два цитохрома *b* – высокопотенциальный ( $b_H$ ) и низкопотенциальный ( $b_L$ ), а также два центра связывания «р» (люменальный) и «п» (стромальный), в которых осуществляется окисление и восстановление молекул пластохинона. В настоящее время нет единой точки зрения на механизм функционирования цитохромного комплекса, что отчасти обусловлено трудностью его экспериментального изучения. Большинство авторов поддерживают гипотезу о так называемом Q-цикле, в котором второй электрон от пластохинола используется для восстановления

низкопотенциального гема цитохром  $b$  ( $b_l$ ) [1, 2, 5, 6]. Однако существуют предположения о возможном функционировании SQ-цикла, где подразумевается, что молекулы семихинона могут диффундировать в мембране и восстанавливать окисленные гемы  $b_l$  и  $b_h$ . [7]. Кроме того, существуют данные о возможности прямой передачи электрона (минуя цитохром  $f$ ) от центра Риска на пластоцианин [8]

Для понимания механизма функционирования цитохромного комплекса, в дополнение к экспериментальным методикам, применяются методы математического моделирования, позволяющие принять или отвергнуть различные гипотезы о функционировании  $bf$  комплекса на основании критерия соответствия теоретических зависимостей экспериментальным данным [1, 2, 9-12], а также оценить ряд кинетических характеристик цитохромного комплекса (констант скоростей отдельных реакций), трудно поддающихся экспериментальному измерению.

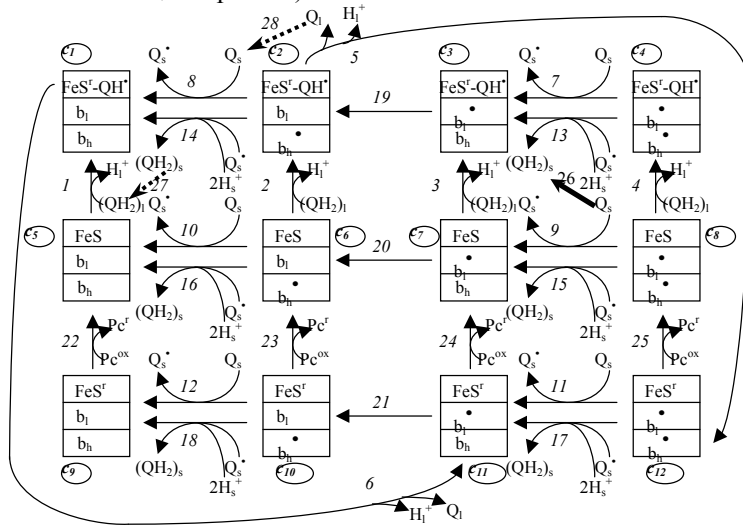
В настоящей работе мы представляем кинетическую модель цитохромного  $bf$  комплекса, основанную на детальном рассмотрении его каталитического цикла, и приводим результаты идентификации параметров модели по экспериментальным данным, опубликованным в [1].

#### **Описание модели $bf$ комплекса.**

Мы рассмотрели  $bf$  комплекс как мембранный фермент, катализирующий перенос электронов от пластохинола на пластоцианин, сопряженный с переносом протонов из стромы хлоропласта в люмен тилакоида. Модель строилась в предположении функционирования Q-цикла Митчелла. Соответствующая совокупность окислительно-восстановительных реакций изображена на рис.1.

Подача электронов в Q-цикл может происходить как от ФС II, так и от ферредоксина (в случае циклического транспорта электронов). В нашей модели этому процессу соответствует реакция восстановления пластохинона, Q, до пластохинола, QH<sub>2</sub>, (показана на схеме жирной стрелкой 26). Эта реакция происходит на стромальной «s» поверхности тилакоидной мембраны, после чего пластохинол диффундирует к люменальной «l» стороне мембраны (реакция 27, жирная пунктирная стрелка в левой

части схемы). После связывания с центром «р»  $bf$  комплекса пластохинол отдаёт один электрон на железосерный центр Риска, FeS, и освобождает один протон в люмен тилакоида с образованием комплекса протонированного семихинона с FeS ( $FeS^T-QH^*$ ) (реакции 1, 2, 3, и 4 в зависимости от редокс состояний FeS и гемов цитохрома  $b$ ).



**Рис.1.** Схема каталитического цикла цитохромного  $bf$  комплекса. FeS – железосерный центр Риска,  $b_l$  и  $b_h$  – низко- и высокопотенциальный гемы цитохрома  $b$ ;  $QH_2$  – пластохинол,  $Q$  – пластохинон,  $Q^*$  – семихинон,  $Pc^T$  и  $Pc^{ox}$  – восстановленная и окисленная формы пластоцианина. Индексы «l» и «s» обозначают люменальную и стромальную локализацию соответствующего компонента системы. Описание цикла приведено в тексте. Цифры рядом со стрелками и буквы над прямоугольниками ( $c_i$ ,  $i=1...12$ ) соответствуют номерам реакций и обозначениям переменных модели.

Если низкопотенциальный гем цитохрома  $b$  ( $b_l$ ) окислен (как в состояниях  $c_1$  и  $c_2$ ), семихинон в составе комплекса ( $FeS^T-QH^*$ ) отдаёт гему  $b_l$  электрон, превращаясь в свободный пластохинон, высвобождая второй протон в люмен тилакоида (реакции 5 и 6). Если  $b_l$  восстановлен, семихинон остаётся связанным с центром Риска до тех пор, пока  $b_l$  не станет окисленным (в результате реакций 7, 13 и 19) и, следовательно, способным принять второй электрон от семихинона. Затем пластохинон диффундирует

со стромальной стороны на люменальную (реакция 28, жирная пунктирная стрелка в верхней части схемы). Трансмембранный перенос электрона между гемами цитохрома  $b$ : (от  $b_l$  к  $b_h$ ) осуществляется в реакциях 19-21. Восстановленный гем  $b_h$  восстанавливает пластохинон в стромальном центре связывания «п», с образованием семихинона  $Q_s^{\cdot}$ , (реакции 7-12). Образовавшийся семихинон берёт второй электрон с гема  $b_h$ , превращаясь в пластохинол и поглощая при этом два протона из стромы хлоропласта (реакции 13-18). Электрон от восстановленного FeS – центра Риске передается на цитохром  $f$  и затем на пластоцианин (реакции 22-25). На схеме не показана стадия, соответствующая переносу электрона между FeS – центром и цитохромом  $f$ , т.к. между этими переносчиками устанавливается быстрое равновесие (константы прямого и обратного переноса  $> 10^5 \text{ c}^{-1}$ , константа равновесия около 3 [1].)

Модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений для концентраций различных редокс-состояний цитохромного комплекса ( $c_1$ - $c_{12}$ ), пластоцианина ( $Pc^f$ ,  $Pc^{ox}$ ), люменальных и стромальных форм пластохинона ( $(QH_2)_l$ ,  $(QH_2)_s$ ,  $Q_l$ ,  $Q_s$ ,  $Q_s^{\cdot}$ ), а также концентраций протонов в люмене ( $H_l^+$ ) и строме ( $H_s^+$ ) тилакоида. Дифференциальное уравнение для каждого  $i$ -го компонента системы имело вид:

$$dX_i/dt = v_{np}(X_i) - v_{nomp}(X_i)$$

где  $X_i$  – концентрация  $i$ -го компонента системы, измеряемая в mM;  $v_{np}(X_i)$  и  $v_{nomp}(X_i)$  – суммарные скорости его производства и потребления, измеряемые в mM/с.

При записи уравнений скорости отдельных реакций мы учитывали зависимость констант скорости и констант равновесия ряда из них от величины трансмембранного электрического потенциала  $\Delta\Psi$  согласно следующим формулам:

$$K_{eq}(\Delta\Psi) = \exp(-\alpha \cdot \Delta\Psi / (RT/F)) \cdot K_{eq}$$

$$k_+(\Delta\Psi) = \exp(-\delta \cdot \alpha \cdot \Delta\Psi / (RT/F)) \cdot k_+$$

$$k_-(\Delta\Psi) = \exp((1-\delta) \cdot \alpha \cdot \Delta\Psi / (RT/F)) \cdot k_-$$

Здесь  $\alpha$  – та доля мембранного потенциала  $\Delta\Psi$ , которая генерируется рассматриваемой стадией при переносе заряда через мембрану,  $\delta$  – та часть мембранного потенциала ( $\alpha \cdot \Delta\Psi$ ), кото-

рая влияет на константу скорости прямой реакции;  $K_{eq}$ ,  $k_+$  и  $k_-$  – константа равновесия, константа скорости прямой и обратной реакций при  $\Delta\Psi = 0$ .

Предполагалось, что в Q-цикле электрогенными являются следующие стадии: трансмембранный перенос электрона от гема  $b_l$  на гем  $b_h$  (реакции 19-21); перенос протонов в реакциях восстановления пластохинона (реакции 13-18) и окисления пластохинола (реакции 1-6). Процессу межгемного переноса электрона отводилось 80% всего электрогенеза, а оставшиеся 20% делились поровну между протон-транспортирующими стадиями, что соответствует данным, полученным в работах [13-15] для цитохромного комплекса  $bc_1$  пурпурных бактерий.

Электрический мембранный потенциал  $\Delta\Psi$  также являлся переменной модели, и его зависимость от времени описывалась дифференциальным уравнением следующего вида:

$$(c_m/F) \times (d(\Delta\Psi)/dt) = v(q_{lumen}) - v(q_{stroma}),$$

где  $c_m$  – удельная емкость тилакоидной мембраны,  $F$  – постоянная Фарадея;

$v(q_l)$ ,  $v(q_s)$  – скорости производства объемной плотности заряда в люмене ( $q_l$ ) и строме ( $q_s$ );  $q_l$  и  $q_s$  измеряются в мМ и являются функциями концентрации ионов  $H^+$  в соответствующих компартментах хлоропласта.

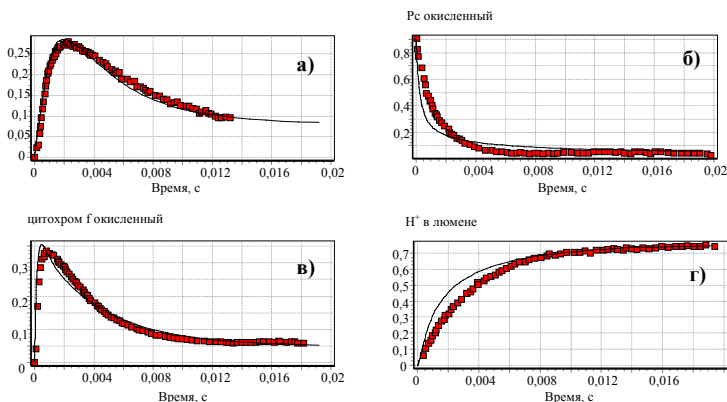
### **Результаты моделирования и идентификации параметров системы.**

К настоящему времени в литературе имеется большое количество экспериментальных данных о протекании реакций, связанных с  $bf$  комплексом. Однако, эти данные получены на разных объектах (интактные клетки [16], изолированные тилакоиды [17, 18], изолированные  $bf$  комплексы [19]), и в различных экспериментальных условиях. Такое разнообразие данных делает их трудно сравнимыми. Вместе с тем, ввиду сложности разработанной нами модели, для ее верификации необходим набор экспериментальных зависимостей, полученных в стандартизованных условиях. Такому требованию в наибольшей степени отвечают данные, опубликованные в [1], полученные на суспензии тилакоидов хлоропластов гороха. В этой работе изучалось

изменение во времени концентраций восстановленного гема цитохрома  $b_h$ , окисленного цитохрома  $f$ , окисленного платоцианина  $Pc^{ox}$  и концентраций протонов в люмене тилакоида  $H_1^+$  после насыщающей вспышки света продолжительностью 15 ns в условиях полной восстановленности пула пластохинонов в начальный момент измерений. Полученные экспериментальные зависимости приведены на рис.2 а-г (показаны квадратами), и были использованы нами для идентификации параметров модели. Все данные здесь и в дальнейшем приводятся в пересчете на один  $bf$  комплекс.

При моделировании описанных экспериментальных зависимостей мы исходили из следующих начальных условий: пул пластохинонов полностью восстановлен (т.е.  $(QH_2)_l = (QH_2)_s = 3$ , с учетом стехиометрии 6 молекул пластохинона на 1 цитохромный комплекс); весь  $bf$  комплекс находится в состоянии с восстановленным FeS центром Риске и окисленным  $b_h$ , т.е. в состояниях  $c_1, c_3, c_9$  и  $c_{11}$ . (мы принимали  $c_1 = c_3 = 0.05$ ,  $c_9 = 0.5$ ,  $c_{11} = 0.4$ ); 90% пластоцианина – в окисленной форме ( $Pc^{ox} = 0.9$ ;  $Pc^f = 0.1$ ); концентрация протонов в люмене соответствует  $pH_l = 6$ , снаружи (в строме) тилакоида –  $pH_s = 7$ .

Большинство параметров модели были «свободными» и уточнялись в результате процедуры фиттинга теоретических зависимостей к экспериментальным данным. В качестве начальных оценок ряда констант скоростей использовались данные, полученные в работах [1, 2]. При моделировании кинетики изменения концентрации восстановленной формы цитохрома  $f$  предполагали, что она отражает кинетику восстановления центра Риске, вследствие установления быстрого равновесия между этими переносчиками [1]. Все расчеты проводились с использованием пакета программ Dbsolve. Теоретические кривые полученные в результате фиттинга приведены на рис. 2 а-г (сплошные линии).



**Рис.2.** Результаты фиттинга модели к экспериментальным данным, опубликованным в [1]. На графиках приведена кинетика индуцированного вспрыской изменения редокс-состояния а) высокопотенциального гема цитохрома  $b_h$ ; б) пластоцианина  $Pc^{ox}$ ; в) цитохрома  $f$ . На рис. г) показан процесс закачки протонов в люмен тилакоида. Все данные приводятся в расчете на один bf комплекс. Квадратами изображены экспериментальные точки, сплошными линиями – теоретические кривые.

Результаты идентификации параметров системы по экспериментальным данным показали, что ряд полученных значений констант скоростей совпадает или имеет близкое к известным оценкам значение, тогда как другие константы существенно отличаются от оценок, сделанных другими авторами. Так, константы скорости переноса электрона от хинола к центру Риске ( $k_1$ - $k_4$ ) в нашей модели имеют значение  $200 - 400 \text{ s}^{-1}$ , что близко к оценкам [1] (около  $200 \text{ s}^{-1}$ ). Близкие оценки получились также для констант скорости переноса электрона на пластоцианин ( $k_{22}$ - $k_{25}$ ):  $3500 - 4000 \text{ s}^{-1}$  в нашей модели,  $2000$ - $4000 \text{ s}^{-1}$  в [1]. Вместе с тем, константы скорости переноса электрона от комплекса семихинона с центром Риске на низкопотенциальный гем  $b_l$ , оцененные в работе [1] как  $10^5 \text{ s}^{-1}$ , в нашей модели имеют более низкое значение (порядка  $100 - 200 \text{ s}^{-1}$ ). Более детальное по сравнению с известными моделями [1, 2, 12] описание каталитического цикла цитохромного комплекса позволило нам оценить ряд констант электронного переноса, неподдающихся определению с использованием других моделей. Так, в моделях



[1, 2, 12] исходно заложено предположение об очень быстром ( $> 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) переносе электрона между гемами  $b_l$  и  $b_h$ , на основании чего и проведена редукция системы. В нашей модели получены более низкие оценки для констант скорости этого процесса ( $k_{19}$ - $k_{21}$ ):  $800$ - $1000 \text{ s}^{-1}$ . В работах [1, 2] содержатся оценки констант скорости переноса электрона от высокопотенциального гема  $b_h$  на пластохинон, связанный в «п»-центре: около  $400 \text{ s}^{-1}$ . В нашей модели было получено, что значения констант скорости этого процесса различаются в зависимости от редокс-состояния цитохромного комплекса. При наличии дополнительного электрона на  $b_l$  (состояния  $c_4$ ,  $c_8$  и  $c_{12}$ ) реакция протекает на порядок быстрее, чем при окисленном  $b_l$  (состояния  $c_2$ ,  $c_6$  и  $c_{10}$ ):  $k_7=k_9=k_{11}=10^3 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_8=k_{10}=k_{12}=10^2 \text{ s}^{-1}$ . И, наконец, высокая степень детализации функционирования Q-цикла в нашей модели позволила, в отличие от других известных моделей, оценить константы скорости переноса электрона от  $b_h$  на семихинон с захватом двух протонов из стромы хлоропласта. Значение констант получилось зависимым от редокс-состояния  $bf$  комплекса и варьировало в пределах  $10^3$ - $10^4 \text{ s}^{-1}$ .

Таким образом, разработанная кинетическая модель цитохромного  $bf$  комплекса позволила добиться удовлетворительного описания кинетического поведения основных его компонентов в предположении функционирования Q-цикла. Использование процедуры идентификации параметров модели позволило оценить ряд констант скоростей реакций, не доступных экспериментальному изучению.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 03-04-49048

### Литература.

1. Hope A.B., Huilgol R.R., Panizza M., Thompson M., Matthews D.B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* 1100, 15-26
2. Hope A.B. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* 1143, 1-22
3. Anderson J.M. (1992) *Photosynth. Res.* 34, 341-357
4. O'Keefe D.P. (1988) *Photosynth. Res.* 17, 189-216
5. Hauska G., Hurt E., Gabellini N., Lockau W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* 726, 97-133
6. Rich P.R. (1985) *Photosynth. Res.* 6, 335-348

7. Wikstrom M., Krab K. (1986) *J. Bioeng. Biomembr.* 18, 181-193
8. Fernandes-Velasko J.G., Jamshidi A., Gong X.-S., Zhou J., Ueng R.Y. (2001) *J. Bio. Chem.* 276, 30598-30607
9. Mauro S., Lannoye R., Vanderloise R., Vander Donckt E. (1986) *Photobiochem. Photobiophys.* 11, 83-84
10. Rich P.R., Heathcote P., Moss D.A. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 892, 138-151
11. Mitchell R., Spillman A., Haehnel W. (1990) *Biophys. J.*, 58, 1011-1024
12. Hope A.B., Liggins J., Matthews D.B. (1989) *Aust. J. Plant. Physiol.* 16, 353-364
13. Дёмин О.В., Вестерхофф Х.В., Холоденко Б.Н. (1998) *Биохимия*. Т. 63. С. 755.
14. Drachev, L.A., Kaurov, B.S., Mamedov, M.D., Mulkidjanian, A.Y., Semenov, A.Y., Shinkarev, V.P., Skulachev, V.P., and Verkhovsky, M.I. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* 973, 189-197.
15. Semenov, A.Y. (1993) *FEBS Lett.* 321, 1-5.
16. Joliot P, Joliot A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 210-226
17. Moss D.A., Rich P.R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 894, 189-197
18. Jones R.W., Whitmarsh J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 933, 258-268
19. Nitschke W., Hauska G., Rutherford A.W. (1989) *Biochim. Bioph. Acta* 974, 223-226.